

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100228510 B1  
(43)Date of publication of application: 10.08.1999

(21)Application number: 1019990002120  
(22)Date of filing: 23.01.1999

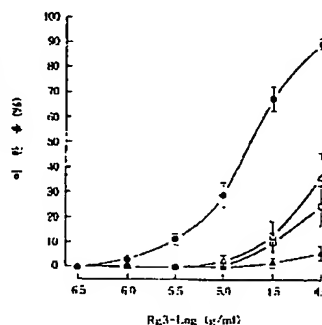
(71)Applicant: CHEIL JEDANG CORPORATION  
PARK, MAN KI  
(72)Inventor: KANG, SU YEON  
KIM, JONG MUN  
KIM, NAK DU  
KIM, WANG YU  
PARK, JEONG IL  
PARK, MAN KI

(51)Int. Cl. A61K 31 /70  
A61K 31 /56

### (54) PRODUCTION OF GINSENOSE-Rg3 AND/OR Rg5

#### (57) Abstract:

PURPOSE: A process for preparing ginsenoside-Rg3 and ginsenoside-Rg5 by heating ginseng at high temperature is provided. Whereby, the compound shows vasodilating activity and is a safe medical component capable of being used without adverse side-effects such as coagulability of blood or fish toxicity. CONSTITUTION: Ginseng is heated at 110 to 180deg.C for 0.5 to 20hrs and extracted with an organic solvent selected from the group consisting of alcohol, hexane, ether, dichloromethane, chloroform, ethylacetate and mixed solvents thereof, treated by chromatography and separated to produce the titled ginsenoside-Rg3 and ginsenoside-Rg5.



COPYRIGHT 2001 KIPO

#### Legal Status

Date of request for an examination (19990123)  
Notification date of refusal decision (00000000)  
Final disposal of an application (registration)  
Date of final disposal of an application (19990730)  
Patent registration number (1002285100000)  
Date of registration (19990810)  
Number of opposition against the grant of a patent ( )  
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ( )

Date of requesting trial against decision to refuse ( )

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6 A61K 31/70 A61K 31/56	(45) 공고일자 2000년03월15일 (11) 공고번호 10-0228510 (24) 등록일자 1999년08월10일
---	--

(21) 출원번호	10-1999-0002120	(65) 공개번호	특0000-0000000
(22) 출원일자	1999년01월23일	(43) 공개일자	0000년00월00일
(62) 원출원	특허 특1996-0053685 원출원일자 : 1996년11월13일	심사청구일자 : 1996년11월13일	

(30) 우선권주장	1019950042997 1995년11월22일 대한민국(KR)
(73) 특허권자	제일제당주식회사 손경식 서울특별시 중구 남대문로 5가 500번지 박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310동 502호
(72) 발명자	박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310동 502호 박정일 서울특별시 강남구 일원본동 한솔마을 301-208호 김종문 서울특별시 송파구 잠실2동 주공아파트 229-313호 강수연 서울특별시관악구신림2동120-2 김왕유 서울특별시송파구가락동가락시영아파트93-306호 김낙두 서울특별시동작구신대방동565-21신대방우성아파트2차101동1101호
(74) 대리인	최규팔 김석중

심사관 : 김이용

(54) 진세노사이드 R<sub>g</sub>3 및/또는 R<sub>g</sub>5의제조방법

요약

본 발명은 인삼의 성분중의 하나인 진세노사이드 R<sub>g</sub>3 및/또는 R<sub>g</sub>5를 활성성분으로서 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 R<sub>g</sub>

3 및 R<sub>g</sub>5는 내피의존적으로 혈관이완작용을 나타내며, 일반적인 사포닌 성분과는 달리 내피세포를 파괴하지 않아 응혈작용이나 어득성 등의 부작용이 없이 사용할 수 있는 안전한 의약성분이다. 진세노사이드 R<sub>g</sub>

3 및 R<sub>g</sub>5는 수삼, 백삼 등의 인삼식물에는 거의 존재하지 않고 홍삼중에 극미량으로만 존재하는 성분으로, 인삼 식물을 110 내지 180℃의 고온에서 0.5 내지 20시간 동안 가열함으로써 그 함량이 현저히 증가한다.

대표도

도1

명세서

## 도면의 간단한 설명

도 1은 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 내피존재하에서 단독투여하였을 때의 혈관이완효과(-○-)를 내피를 제거하고 투여하였을 때(-○-), 내피존재하에서 Rg<sub>3</sub>를 10<sup>-6</sup>M의 메틸렌블루(MB)와 병용투여하였을 때(-△-) 및 10<sup>-6</sup>M의 L-니트로알기닌(L-NLA)과 병용투여하였을 때(-△-)의 혈관이완효과와 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예 7에서 제조한 가공 파낙사디올계 사포닌 분획을 내피존재하에서 투여하였을 때(-○-) 및 내피를 제거하고 투여하였을 때(-○-)의 혈관이완효과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 HUVEC 세포에 대한 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>와 용매로 사용한 디메틸설폭사이드(DMSO)의 세포독성 실험결과를 나타낸 그래프로 세포에 DMSO를 가하여 배양하였을 때(-○-) 및 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 DMSO에 용해시킨 용액을 가하여 배양하였을 때(-▽-)의 세포의 생존율을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 4는 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>를 내피존재하에서 단독투여하였을 때의 혈관이완효과(-○-)를, 내피를 제거하고 투여하였을 때(-○-), 내피존재하에서 Rg<sub>5</sub>를 10<sup>-6</sup>M의 메틸렌블루(MB)와 병용투여하였을 때(-▽-) 및 10<sup>-6</sup>M의 L-니트로알기닌(L-NLA)과 병용투여하였을 때(-△-)의 혈관이완효과와 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 HUVEC 세포에 대한 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>와 용매를 사용한 정제수(distilled water)의 세포독성 실험결과를 나타낸 그래프로, 세포에 정제수를 가하여 배양하였을 때(-○-) 및 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>를 정제수에 용해시킨 용액을 가하여 배양하였을 때(-□-)의 세포의 생존율을 비교하여 나타낸 그래프이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 인삼의 특정 유효성분을 활성성분으로서 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 인삼의 사포닌계 성분중의 하나인 진세노사이드 Rg

3 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 활성성분으로 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다.

인삼은 고래로부터 가장 대표적인 자양강장제로서 널리 사용되어 오고 있으며, 최근에는 그 성분과 약효에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있어 그 신비한 약효가 현대과학적인 조명을 받고 있다.

일반적으로 인삼은 재배하여 채취한 그대로의 수삼, 수삼을 상온에서 건조시킨 백삼 또는 수삼을 98 내지 100℃에서 가열처리하여 제조되는 홍삼의 형태로 이용되고 있다. 이 중에서 특히 홍삼은 백삼보다 훨씬 약효가 강한 것으로 알려져 있는데, 최근들어 홍삼의 특이성분에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 성분들은 홍삼을 제조하는 과정에서 생성되는 것으로 홍삼의 우수한 약효를 설명해줄 수 있는 성분으로 평가되고 있다.

따라서 본 발명자들은 홍삼의 특이성분을 증가시켜 인삼의 약효를 강화시킬 수 있는 수단을 연구하게 되었으며, 그 결과 인삼을 110 내지 180℃의 고온에서 0.5 내지 20시간 동안 가열하여 처리하게 되면 기존의 수삼이나 백삼 또는 홍삼보다 약효가 훨씬 증강된 가공인삼이 제조되는 것을 확인하였다. 이러한 가공인삼중에 존재하는 각종성분들을 분리하여 그의 약효를 검증하는 과정에서 본 발명자들은 백삼이나 홍삼에는 전혀 존재하지 않거나 매우 미량으로 존재하는 성분으로 지금까지는 약효가 거의 알려지지 않았던 진세노사이드 Rg

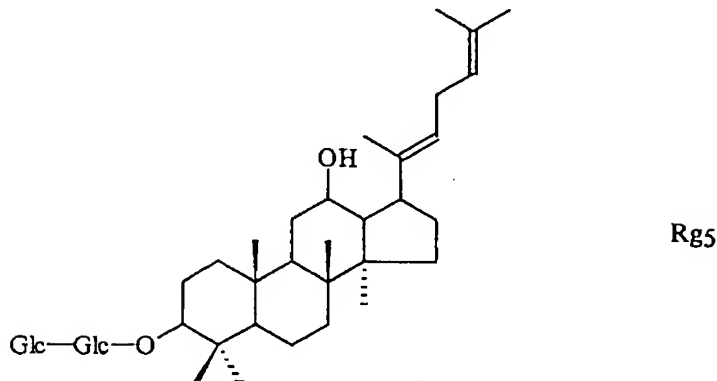
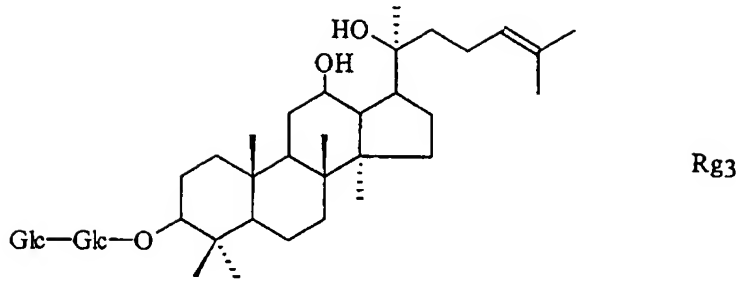
3 및 Rg<sub>5</sub>가 우수한 혈관이완효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

#### 발명이 이루고자하는 기술적 과제

따라서, 본 발명은 활성성분으로서 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

본 발명에 따르는 조성물에서 활성성분으로 사용되는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 다음과 같은 구조를 갖는 사포닌 화합물로서 본 발명에서는 순수한 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 사용하거나, 또는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub> 성분이 강화된 가공인삼 또는 그의 추출물을 사용할 수도 있다.



본 발명에 따른 조성물에서 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 가공인삼추출물을 활성성분으로 사용하는 경우에 추출물중의 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>의 함량은 적어도 10%(w/w)인 것이 바람직한데, 이는 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>의 함량이 10% 미만일 경우에는 목적하는 혈관이완 효과를 충분히 얻기 위해서 너무 다량의 인삼추출물이 사용되어야 하기 때문이다.

본 발명에 따른 조성물에서 순수한 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>, 또는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>가 강화된 인삼추출물은 인삼 또는 인삼잎 등을 고온에서 가열처리하여 얻은 가공인삼, 또는 인삼추출물의 산가수분해 물로부터 수득할 수 있다.

진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>가 강화된 인삼추출물은 인삼사포닌을 함유하는 파낙스속 식물, 예를 들면 파낙스 진생(Panax ginseng), 파낙스 노토진생(Panax notoginseng), 파낙스 퀸퀘폴리움(Panax quinquefolium), 파낙스 야포니쿠스(Panax japonicus) 등이나 또는 이들 식물의 잎, 이들 식물의 조직배양물, 또는 이들의 물 또는 저급알콜에 의한 추출물을 110 내지 180℃의 온도에서 0.5 내지 20시간동안 가열처리하고, 수득된 가공인삼을 물 또는 적절한 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후에 추출물을 감압하에 농축시키고 물에 현탁시킨 다음, 비극성 유기용매, 예를 들면 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후에 남은 수층을 부탄올과 같은 극성 유기용매로 추출하여 이 추출물을 크로마토그래피함으로써 Rg

<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 분획을 얻거나 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>를 동시에 함유하는 분획을 수득할 수 있다. 이때 크로마토그래프를 반복수행하면 진세노사이드 Rg

<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>의 함량을 더욱 높일 수 있으며, 함량이 높아진 분획을 적절한 용매계, 예를 들면 물, 저급알콜, 저급케톤, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매와 같은 용매계에서 검정화시키면 순수한 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>를 수득할 수 있다. 이 방법에서는 인삼을 가열처리하는 과정에서 인삼중에 존재하는 파낙사디올게 사포닌인 진세노사이드 Ra, Rb

<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd의 20번 탄소에 결합한 당이 떨어져 나감으로써 목적하는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>가 생성되고, Rg<sub>3</sub>가 계속하여 탈수반응을 일으켜 20번 위치에 이중결합이 생성됨으로써 Rg<sub>5</sub>가 생성된다. 경우에 따라 상기의 과정에서 가열처리하는 단계와 유기용매 추출단계를 바꾸어서 수행하거나, 고온에서 가열처리하는 대신에 온화한 조건 하에서, 예를 들면 30 내지 100℃에서, 바람직하게는 70℃에서 가열하면서 산, 예를 들면 염산, 질산, 과염소산 등과 같은 묽은 광산, 또는 아세트산, 타타르산, 옥살산 등과 같은 저급 유기산으로 산처리하여 수행하는 경우에

도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

또한 상기의 과정에서 인삼 대신에 공지의 화합물인 진세노사이드 Ra, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd 등의 성분 또는 이들의 분획을 직접 상기한 바와 같은 방법으로 가열하거나, 산가수분해하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

한편, Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 인삼추출물을 제조하는 경우에, 인삼을 가열하기 전에 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 알콜 용매, 에테르 용매, 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 원치않는 성분인 파낙사트리올게 사포닌 성분을 제거하여 파낙사디올게 사포닌 성분을 고농도로 함유하는 분획을 얻어 이것을 상기 언급한 바와 동일한 방법으로 가열처리함으로써 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 다량으로 함유하고 파낙사트리올게 사포닌 성분을 함유하지 않는 가공 파낙사디올게 사포닌 분획을 수득하여 이것을 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 가공인삼추출물로 사용할 수도 있다.

본 발명에 따르는 활성성분으로서 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 조성물은 강력한 혈관이완효과를 가지고 있어 순환기계 장애로 인한 고혈압, 동맥경화, 혈액순환장애, 당뇨병, 성기능장애, 기억력장애 등의 질환에 대한 예방 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 목적으로 임상적으로 이용시에 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 통상적인 담체와 함께 배합하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를 들면 정제, 캡슐제, 트로치제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사시에 주사용 증류수로 재제조하여 사용할 수 있는 즉시사용형 주사용 건조분말 등의 형태인 주사용 제제, 연고제, 크림제, 액제 등의 국소적용형 제제 등의 다양한 제제로 제형화시킬 수 있다.

본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 담체는 약제학적 분야에서 통상적인 것으로, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 있으며, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제, 안정제 등이 있고, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 운할제, 보존제 등이 있다. 이렇게 제조된 약제학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로, 예를 들면 정맥내, 피하, 목강내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 또한 경구투여시에 약제가 위산에 의해 분해되는 것을 방지하기 위하여 제산제를 병용하거나, 정제 등의 경구투여용 고형제제를 장용피로 피복한 제제로 제형화하여 투여할 수도 있다.

본 발명에 따르는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>의 인체에 대한 투여량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로는 성인에게 1일에 5 내지 500mg, 바람직하게는 10 내지 200mg의 양으로 투여되도록 한다. 따라서, 본 발명의 조성물을 단위투여형으로 제조시에 각각의 단위투여형은 상기 언급된 유효용량 범위를 고려하여 진세노사이드 Rg

3 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 5 내지 500mg, 바람직하게는 10 내지 200mg 함유하도록 제형화시킬 수 있다. 이렇게 제형화된 단위투여형은 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나, 일정시간 간격으로 수회, 바람직하게는 1 내지 6회 분할 투여할 수 있다.

본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 후술하는 실험결과로부터 입증되는 바와 같이 혈관내피에 대한 손상없이 혈관을 이완시키는 작용을 나타내므로 용혈이나 여독성 등의 부작용이 없을 뿐만 아니라, 실험동물에 대하여 급성독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있다.

본 발명은 이하의 실시예 및 실험예에 의해 더욱 상세히 설명되나 본 발명이 이들에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[실시에 1] 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 함유하는 인삼추출물의 제조방법에 수삼 100g을 넣고 130℃에서 2시간 동안 가열처리하였다. 이 가공인삼을 메탄올 200ml로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100ml에 현탁시켜 에테르 100ml씩으로 3회 추출한 다음, 남은 수층을 수포화 부탄올로 100ml씩으로 3회 추출하여 사포닌이 함유된 부탄올 추출액을 얻었다. 이 부탄올 추출액을 건조하여 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그래피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg

3를 60% 함유하는 분획 1.5g을 수득하였다.

[실시에 2] 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 인삼추출물의 제조실시에 1에서와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>를 50% 함유하는 분획 1.0g을 수득하였다.

[실시에 3] 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 함유하는 인삼추출물의 제조조건된 미삼 1kg에 메탄올 2ℓ를 가하여 수욕상에서 4시간 동안 환류시켜 추출하고 여과하여 수득한 인삼 액기스를 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시료상의 인삼 추출물을 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그래피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg

$R_3$ 를 65% 함유하는 분획 20g을 분리하여 수득하였다.

[실시에 4] 진세노사이드  $R_{G5}$ 를 함유하는 인삼추출물의 제조실시에 3에서와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드  $R_{G5}$ 를 60% 함유하는 분획 10g을 수득하였다.

[실시에 5] 진세노사이드  $R_{G3}$ 를 함유하는 인삼추출물의 제조백상 1kg에 메탄올 2ℓ를 가하여 수욕상에서 4시간 동안 환류추출하고 여과하여 수득된 인삼엑기스를 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시료상의 인삼 추출물을 공지된 방법[참조: 약학회지 제 35 권 5 호, 432-437 (1991)]에 의하여 산처리하였다. 즉 인삼 추출물을 물/아세트산 (1:1) 혼합용매 1ℓ에 용해시키고 70℃에서 2시간동안 교반하면서 가열한 다음 용매를 제거하여 얻은 산처리된 인삼 추출물을 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그래피시켜 목적하는 진세노사이드  $R_G$

$R_3$ 를 72% 함유하는 분획 20g을 분리하여 수득하였다.

[실시에 6] 진세노사이드  $R_{G5}$ 를 함유하는 인삼추출물의 제조실시에 5와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드  $R_{G5}$ 를 60% 함유하는 분획 10g을 수득하였다.

[실시에 7] 가공 파낙사디올게 사포닌 분획의 제조인삼 1kg을 메탄올 200ml로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올을 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100ml에 현탁시켜 에테르 100ml씩으로 3회 추출하였다. 남은 수층을 에틸아세테이트:부탄올=10:1 혼합용매로 3회 추출하고, 남은 수층을 다시 부탄올 100ml로 3회 추출하여 파낙사디올게 사포닌 분획을 얻었다. 이 파낙사디올게 사포닌 분획을 실시예 1에서와 동일한 방법으로 130℃에서 3시간 동안 가열처리하여 가공 파낙사디올게 사포닌 분획 약 40g을 수득하였다.

[실시에 8] 진세노사이드  $R_{G3}$ 의 제조상기 실시예 3에서 수득한 진세노사이드  $R_{G3}$  함유 분획 1g을 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실시예 1에서와 동일한 방법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그래피를 반복수행하여 목적하는 진세노사이드  $R_{G3}$ 를 92% 함유하는 분획 500mg을 수득하였다. 수득된 진세노사이드  $R_G$

$R_3$  함유 분획을 메탄올 및 에틸아세테이트 혼합용매로부터 재결정화시켜 목적하는 진세노사이드  $R_{G3}$  약 400mg을 수득하였다.

수득한 진세노사이드  $R_{G3}$ 는 문헌[참조: 일본약학잡지, 103(6), 612-622 (1983) 또는 약학회지 제 35 권 5 호, 432-437 (1991)]에 공지된 것과 일치하는  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼 및 질량 스펙트럼을 나타낸다. 즉 수득한 진세노사이드 약 10mg을 피리딘-d

$_5$ (99.5%) 600 $\mu$ ℓ에 용해시키고 탄소핵자기공명스펙트럼을 측정하면 특징적인  $R_G$

$_3$ 의 피크를 나타낸다. 또한 진세노사이드  $R_G$

$_3$ 의 질량스펙트럼(FAB+)은 785([M+H] $^{+}$ )나 807([M+Na] $^{+}$ )의 분자이온 피크를 나타낸다.

[실시에 9] 진세노사이드  $R_{G5}$ 의 제조상기 실시예 4에서 수득한 진세노사이드 함유 분획 1g에 대해 실시예 8에서와 동일하게 실시하여  $R_{G5}$ 를 약 90% 함유하는 분획 200mg을 수득하였으며, 수득된 진세노사이드  $R_{G5}$  함유 분획을 메탄올 및 에틸아세테이트 혼합용매로부터 재결정화시켜 목적하는 진세노사이드  $R_{G5}$  약 150mg을 수득하였다.

수득한 진세노사이드  $R_{G5}$ 는 다음과 같은 이화학적 특징을 나타낸다.

MS(FAB $^{+}$ , m/z): 789([M+Na] $^{+}$ ), 805([M+K] $^{+}$ )  $^{13}C$ -NMR (ppm, 피리딘-d $_5$ ):  $\delta$  13.0, 16.0, 16.5, 16.6, 17.0, 18.5, 25.8, 26.7, 27.0, 27.4, 28.1, 32.3, 32.6, 35.3, 37.0, 39.2, 39.7, 40.2, 50.5, 50.9, 51.2, 56.4, 62.6, 62.8, 71.4, 72.4, 72.6, 77.2, 77.9, 78.1, 78.3, 83.5, 88.9, 105.2, 106.1, 123.5, 124.6, 131.2, 140.2

[실험예 1] 진세노사이드  $R_{G3}$  및  $R_{G5}$ 의 혈관이완작용혈관의 내피는 혈류 및 혈관의 긴장도를 조절하고 혈소판 응집을 억제하는 등 체내 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특히 혈관의 내피는 EDRF(endothelium-derived relaxing factor, 내피유리인자), 즉 일산화질소(NO)를 유리하며, 일산화질소는 혈관평활근에 작용하여 가용성 구아닐레이트 사이클라제를 활성화하여 조직내 사이클릭 GMP를 증가시켜 혈관을 이완시키는 것으로 알려져 있다. 고혈압, 고콜레스테롤혈증 등의 순환기계 질환에 의하여 내피의 기능이 손상되면 일산화질소의 유리가 감소되어 정상적인 혈관조절기능이 손실된다. 그러나 대부분의 사포닌 성분들은 내피세포까지 파괴하면서 혈관이완작용을 나타내므로 용혈이나 어독성 등의 심각한 부작용을 나타내므로 바람직하지 못하였다. 따라서 내피에 대한 손상이 없이 혈관에 대해 이완작용을 나타내는 성분이 필요하다.

본 발명자들은 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>가 동상의 사포닌 성분과는 달리 강력한 내피 의존성 혈관이완작용을 나타내는 것을 확인하였으며, 이하에서는 이를 실험적으로 입증한다.

#### 1. 실험방법:

300 내지 400g의 스프라그-도울리(Sprague-Dowley: SD) 랫트의 흉부 대동맥을 신속하게 적출하여 크랩스-링거-중탄산나트륨 용액(대조용액, NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO<sub>4</sub>

1.2; KH

<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; CaCl

<sub>2</sub> 2.5; NaHCO

<sub>3</sub> 25; CaEDTA 0.016; 포도당 11.1mM)에 옮겼다. 내부의 혈액과 혈관주위의 지방 및 결합조직을 제거하고 약 2 내지 3mm 길이로 대동맥환을 만들어 pH 7.4인 대조용액이 채워진 25ml 장기챔버에 수직으로 현수하였다. 일부의 대동맥환은 내부에 핀셋을 넣어 종이타올위에서 7 내지 8회 굴려서 내피세포를 제거한 혈관으로 사용하였다. 대동맥환의 하부는 장기챔버에 고정하고 상부는 등자를 통하여 등척성장력의 기록을 위해 트랜스듀서 커플러(transducer coupler)에 연결하였다.

장기챔버에 페닐에프린 10<sup>-6</sup>M을 가하여 안정된 수축을 나타내는 대동맥환에 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>의 디메틸설폭사이드 용액을 단독으로, 또는 메틸렌블루(MB) 10<sup>-6</sup>M 또는 L-니트로알기닌(L-NLA) 10<sup>-6</sup>M과 함께 가하여 혈관이완작용을 관찰하였다. 페닐에프린 10

<sup>-6</sup>M에 의한 수축도를 100%로 하고 이것을 기준으로 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>에 의한 이완도를 %로 나타내었다.

#### 2. 실험결과

도 1 및 도 4에 도시된 바와 같이, 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 각각 내피에 존재하는 혈관을 농도의존적으로 이완시켰다. 그러나 내피를 제거한 혈관에 대해서는 작용을 나타내지 않았고, 일산화질소 합성효소의 저해제인 L-니트로알기닌(L-NLA) 및 가용성 구아닐레이드 사이클라제 억제제인 메틸렌블루(MB)에 의해 진세노사이드 Rg

<sub>3</sub> 또는 Rg<sub>5</sub>의 혈관이완작용은 유의성있게 억제되었다.

이러한 결과로부터 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 내피세포가 있는 혈관에서만 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 진세노사이드 Rg

<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 내피세포까지 파괴하는 다른 사포닌 성분과는 달리 용혈작용이나 어독성 등의 부작용을 나타내지 않는 안전한 의약품임을 알 수 있었다.

[실험예 2] 가공 사포닌 분획의 혈관이완작용 1. 실험방법:

전술한 실시예 7에서 수득한 가공 파낙사디올계 사포닌 분획에 대하여 실험예 1의 실험방법과 동일한 방법으로 혈관이완작용을 측정하였다.

#### 2. 실험결과:

도 2에 도시한 바와 같이 가공 파낙사디올계 사포닌 분획은 내피가 존재하는 혈관을 농도의존적으로 이완시켰다. 그러나 내피를 제거한 혈관에 대해서는 작용을 나타내지 않았고 일산화질소 합성효소의 저해제인 L-니트로알기닌 및 가용성 구아닐레이드 사이클라제 억제제인 메틸렌블루에 의해 혈관이완작용은 유의성있게 억제되었다.

이러한 결과로부터 실시예 7에서 수득된 가공 파낙사디올계 분획은 내피세포가 있는 혈관에서만 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 가공 파낙사디올계 분획은 내피세포까지 파괴하는 다른 사포닌 성분과는 달리 용혈작용이나 어독성 등의 부작용을 나타내지 않는 안전한 의약품임을 알 수 있었다.

[실험예 3] 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>의 세포독성실험 1. 실험방법:

M199 배지에서 배양한 HUVEC(사람의 제대정맥 내피세포)을 세포 20000개/180μl의 농도가 되도록 생리식염수



에 현탁시켜 세포현탁액을 만들어 96-웰 플레이트당 180 $\mu$ l 씩 가하고 용매인 디메틸설폭사이드와 디메틸설폭사이드에 용해된 Rg<sub>3</sub>를 20 $\mu$ l 씩 가한 다음, 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소의 세포배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이어서 인산염완충액에 용해시킨 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(2mg/ml)을 50 $\mu$ l 씩 가하고 다시 4시간 동안 상기와 동일한 조건하에서 배양한 후, 상등액을 제거하고 디메틸설폭사이드를 200 $\mu$ l 가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도값을 세포수로 환산하여 용매인 디메틸설폭사이드의 경우와 Rg

<sub>3</sub>의 경우에 세포성장을 50% 억제시키는 농도인 IC<sub>50</sub>값을 구하여 세포독성의 지표로 하였다.

## 2. 실험결과:

디메틸설폭사이드의 경우(대조군)는 0.6%부터 세포독성을 보이기 시작하여 6%에서는 100% 세포성장을 억제하여 용량-반응성을 보였으며, IC

<sub>50</sub>은 18.4  $\mu$ g/ml이었고, Rg

<sub>3</sub>는 1 내지 100  $\mu$ g/ml 농도범위에서 디메틸설폭사이드와 같은 양상을 보였으며, IC<sub>50</sub>은 26.7  $\mu$ g/ml로서, 오히려 약간 높은 값을 보여 세포독성이 적은 경향을 나타냈다. 즉 Rg

<sub>3</sub> 투여군은 대조군 보다 세포의 생존율이 더 높아 오히려 세포성장 촉진효과가 있는 것으로 나타났다(도 3).

[실험예 4] 진세노사이드 Rg<sub>5</sub>의 세포독성 실험1. 실험방법:

M199 배지에서 배양한 HUVEC(사람의 제대정맥 내피세포)을 세포 20000개/180 $\mu$ l의 농도가 되도록 생리식염수에 현탁시켜 세포현탁액을 만들어 96-웰 플레이트당 180 $\mu$ l 씩 가하고 용매인 정제수와 정제수에 용해된 Rg<sub>5</sub>를 20 $\mu$ l 씩 가한 다음, 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소의 세포배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이어서 인산염완충액에 용해시킨 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(2mg/ml)을 50 $\mu$ l 씩 가하고 다시 4시간 동안 상기와 동일한 조건하에서 배양한 후, 상등액을 제거하고 디메틸설폭사이드를 200 $\mu$ l 가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2. 실험결과:

도 5에 나타낸 바와 같이, 진세노사이드 Rg<sub>5</sub> 투여군은 비록 통계적인 유의성은 없었으나 대조군에 비하여 세포생장이 더욱 활발하였다. 따라서, 진세노사이드 Rg

<sub>5</sub>는 세포에 대한 독성이 없음을 알 수 있었다.

[조성물에]이하에서, 활성성분으로 사용된 Rg<sub>3</sub>는 Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>에 의해 대체될 수 있고, Rg<sub>3</sub>를 함유하는 분획은 Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>를 함유하는 분획에 의해 대체될 수 있다.

[조성에 1]옥수수전분 44g결정성 셀룰로오즈 40g카르복시메틸셀룰로오즈칼슘 5g마그네슘스테아레이트 1g실시에 1에서 수득한 분획 10g계 100g상기한 처방에 따라 각 성분을 균일하게 혼합한 다음 타정기에서 압축성형하여 1정 500mg의 정제를 제조하였다. 이 정제 1정에는 실시예 1에서 수득한 분획 50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10정을 수회에 나누어 복용한다.

[조성에 2]결정성 셀룰로오즈 34.5g

10% 하이드록시프로필셀룰로오즈 에탄올용액 50g카르복시메틸셀룰로오즈칼슘 5g마그네슘스테아레이트 0.5g

실시에 5에서 수득한 분획 10g계 100g상기한 처방에 따라 결정성 셀룰로오즈, 10% 하이드록시프로필셀룰로오즈 에탄올용액 및 실시예 5에서 수득한 분획을 균일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 건조시키고 분쇄한 후 카르복시메틸셀룰로오즈칼슘 및 마그네슘스테아레이트를 혼합하여 타정기에서 압축성형하여 1정 500mg의 정제를 제조하였다. 이 정제 1정에는 실시예 5에서 수득한 분획 50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10정을 수회에 나누어 복용한다.

[조성에 3]주사용 증류수 86.5g

에탄올 5g대두인지질 2.5g

글리세린 5g실시에 8에서 수득한 Rg<sub>3</sub> 1g계 100g상기한 처방에 따라 실시예 8에서 수득한 Rg<sub>3</sub>를 에탄올 및 대두

인지질에 용해시키고, 여기에 주사용 증류수와 글리세린의 용액을 가하여 유효시켜 주사제를 제조하였다.

[조성에 4]① 염산 피리독신 300mg② 니코틴산아미드 1g③ 칼슘판토텐네이트 1g④ 리보플라빈 200mg⑤ 시트르산 30g⑥ 실시예 1에서 수득한 분획 20g⑦ 음양곽 엑기스 200mg⑧ 물을 가하여 총 10ℓ로 한다.

상기한 처방에 따라 성분 ① 내지 ⑦을 성분 ⑧에 용해시켜 액제를 제조하였다. 이 액제 100ml는 실시예 1에서 얻은 분획 200mg을 함유한다.

[조성에 5]결정성 셀룰로오즈 440g마그네슘스테아레이트 10g실시예 8에서 수득한 Rg<sub>3</sub> 50g계 500g상기한 처방에 따라 모든 성분을 균일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 조립하고 충전기에 충전하여 캡셀당 500mg의 캡셀제를 제조하였다. 이 캡셀제 1 캡셀에는 Rg

<sub>3</sub> 50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10 캡셀을 수회 나누어 복용한다.

#### 발명의 효과

본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및 Rg<sub>5</sub>는 내피의존적으로 혈관이완작용을 나타내며, 일반적인 사포닌 성분과는 달리 내피세포를 파괴하지 않아 응혈작용이나 어독성 등의 부작용이 없이 사용할 수 있는 안전한 의약성분이다.

#### (57)청구의 범위

##### 청구항1

인삼을 110 내지 180℃의 온도에서 0.5 내지 20시간 동안 가열처리하고, 수득된 가공인삼을 알콜, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 그들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기용매로 추출한 후에 추출물을 크로마토그래피 처리하고 진세노사이드 Rg

<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 분리수득하는 단계를 포함함을 특징으로 하여 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 제조하는 방법.

##### 청구항2

인삼을 알콜, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 그들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기용매로 추출하고, 추출물을 110 내지 180℃에서 0.5 내지 20시간 동안 가열처리한 후에 크로마토그래피 처리하고 진세노사이드 Rg

<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 분리수득하는 단계를 포함함을 특징으로 하여 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 제조하는 방법.

##### 청구항3

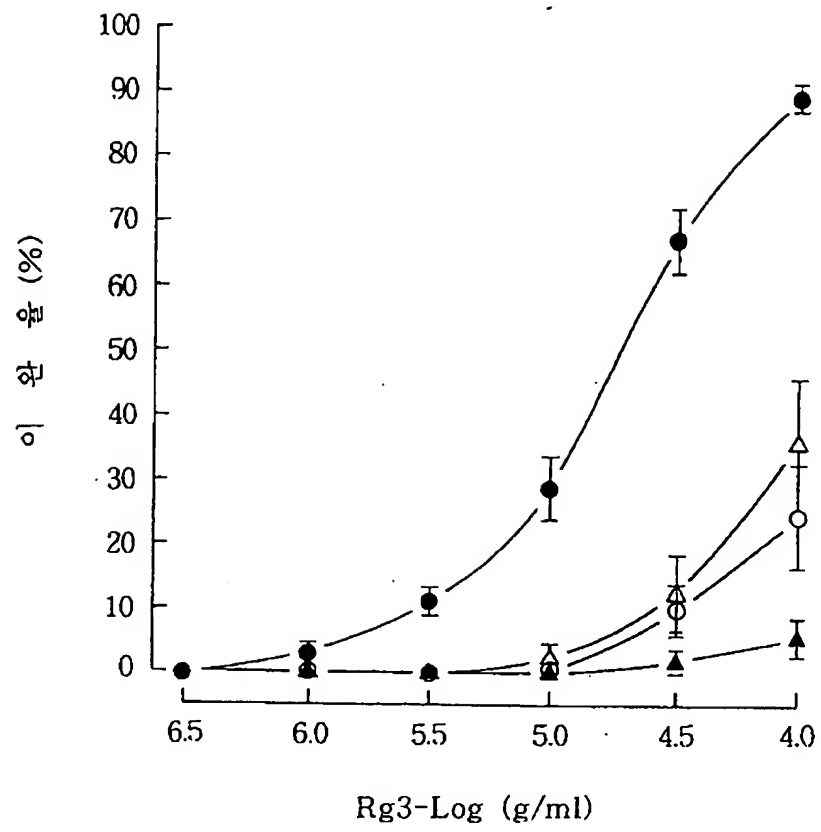
인삼을 알콜, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 그들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기용매로 추출하고, 추출물을 50 내지 100℃에서 산으로 처리한 후에 크로마토그래피 처리하고 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 분리수득하는 단계를 포함함을 특징으로 하여 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 및/또는 Rg<sub>5</sub>를 제조하는 방법.

##### 청구항4

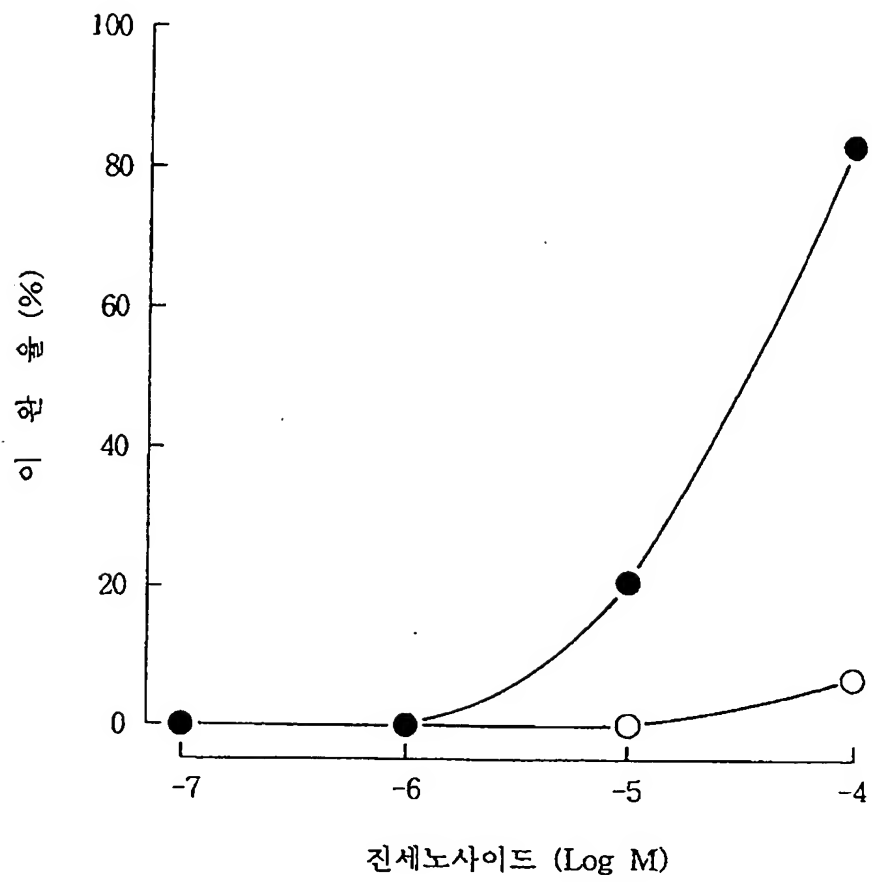
인삼을 알콜, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 그들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기용매로 추출하여 파낙사디올계 분획을 수득하고 이 분획을 110 내지 180℃에서 0.5 내지 20시간 동안 가열처리하여 가공 파낙사디올계 사포닌을 제조하는 방법.

#### 도면

##### 도면1



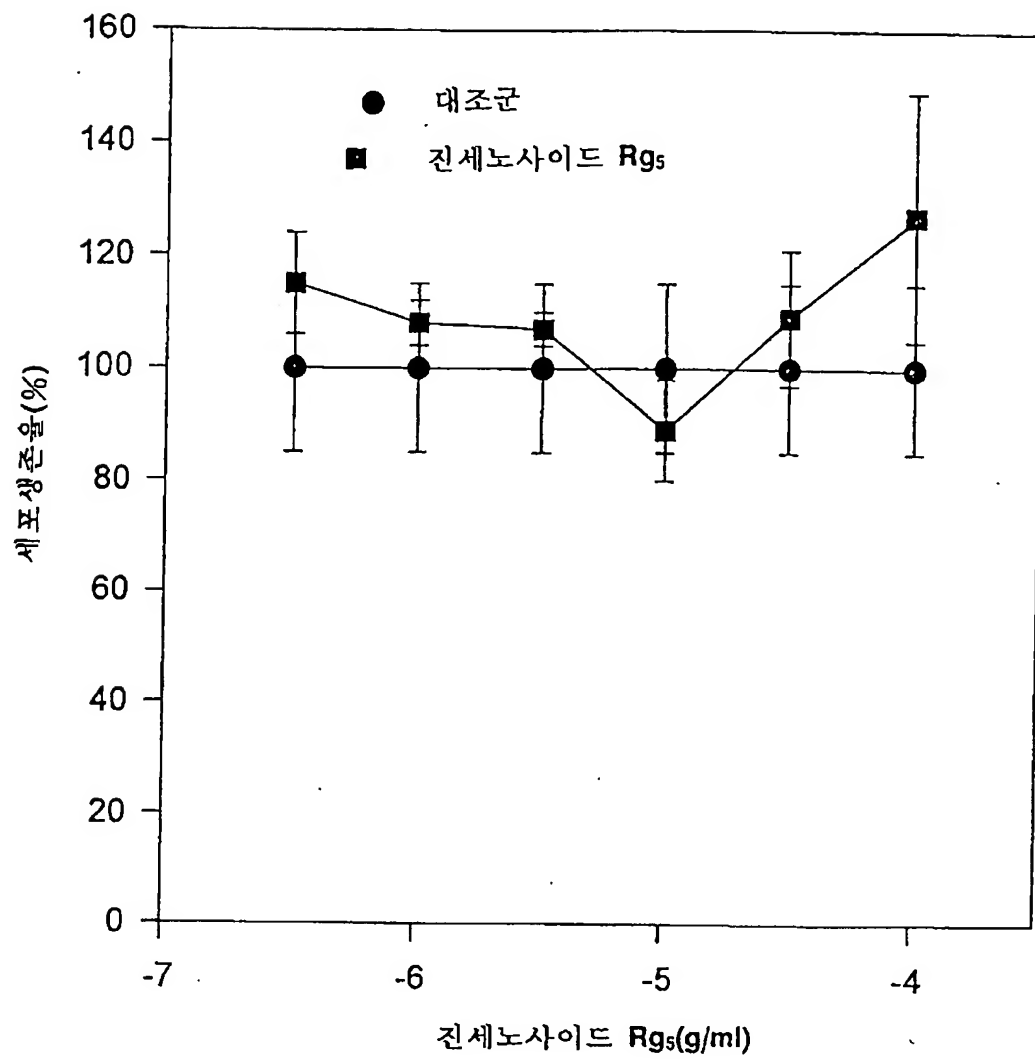
도면2



도면3

도면4

도면5



진세노사이드 Rg5의 MTT분석. 수치는 평균+SEM(n=5-6)으로 나타내었다.

(3) KR 0228510 (CHEIL JEDANG Co. et al.)

#### Abstract

The present invention relates to a composition for a vasodilation agent comprising ginsenosides of Rg3 and/or Rg5 as an active ingredient. The ginsenosides of Rg3 and Rg5 of the present invention exhibits endothelial cell-dependent vasodilation activity. They are considered as safe pharmaceutical components they because they do not destroy endothelial cells, unlike other saponin components, thus do not have any side effects such as coagulation or fish toxicity.

#### Claims

1. A method of preparing ginsenosides of Rg3 and/or Rg5 comprising:
  - (a) heating ginseng at 110 - 180 °C for 0.5-20 hrs;
  - (b) performing extraction of thus obtained processed ginseng with an organic solvent selected from a group consisting of alcohol, hexane, ether, dichloromethane, chloroform, ethylacetate and a mixture thereof; and
  - (c) separately obtaining Rg3 and/or Rg5 by treating the resulting extract via chromatography.
2. A method of preparing ginsenosides of Rg3 and/or Rg5 comprising:
  - (a) performing extraction of ginseng with an organic solvent selected from a group consisting of alcohol, hexane, ether, dichloromethane, chloroform, ethylacetate and a mixture thereof;
  - (b) heating the resulting extract at 110 - 180 °C for 0.5-20 hrs; and
  - (c) separately obtaining Rg3 and/or Rg5 by treating the resultant via chromatography.
3. A method of preparing ginsenosides of Rg3 and/or Rg5 comprising:
  - (a) performing extraction of ginseng with an organic solvent selected from a group consisting of alcohol, hexane, ether, dichloromethane, chloroform, ethylacetate and a mixture thereof;
  - (b) treating the resulting extract at 110 - 180 °C for 0.5-20 hrs with an acid; and



(c) separately obtaining Rg3 and/or Rg5 by treating the resulting extract via chromatography.

4. A method of preparing processed panaxadiol-based saponins comprising:

(a) obtaining a panaxadiol-based fraction of ginseng by performing extraction of ginseng with an organic solvent selected from a group consisting of alcohol, hexane, ether, dichloromethane, chloroform, ethylacetate and a mixture thereof; and

(b) heating the resulting fraction at 110 - 180 °C for 0.5-20 hrs.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ ~~COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS~~
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**